

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**SLEDOVÁNÍ EXPRESE VYBRANÝCH MARKERŮ
ATEROGENEZE U ApoE/LDLr – DEFICIENTNÍCH MYŠÍ**

**THE STUDY OF EXPRESSION OF VARIOUS MARKERS OF
ATHEROGENESIS IN APOE/LDLR – DEFICIENT MICE.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové 2009

PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.
Kristýna Rambousková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

„Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za možnost konzultace, ochotu a čas, který věnoval mé práci.

Obsah:

1. Úvod	7
2. Mikroskopická anatomie cév	10
2.1 Arterie	11
2.2 Kapiláry	12
2.3 Vény	13
3. Patogeneze aterosklerózy	15
3.1 Faktory aterogeneze	16
3.2 Signální dráha MAPK	19
4. NF-κB a jeho role v aterogenezi	22
4.1 Aktivovaná molekula NF- κ B a její cílové geny u aterosklerotických lézí	24
5. Myší modely aterosklerózy	26
5.1 Kmen apolipoprotein E - deficientních myší	27
5.2 Kmen LDL receptor deficientních myší	29
5.3 Kmen s dvojitým deficitem – apolipoproteinu E a LDL receptoru	29
6. Cíl práce	30
7. Experimentální část	31
7.1 Zvířata a předepsaná dieta	31
7.2 Biochemická analýza	31
7.3 Imunohistochemie	32
7.4 Statistická analýza	33
8. Výsledky	34
8.1 Biochemická analýza	34
8.2 Imunohistochemická analýza	35
9. Diskuze	40
10. Závěr	43
11. Literatura	44

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktoru kappaB (NF- κ B). Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší ve věku 8 a 16 týdnů.

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Jedna skupina (n=8) byla krmena pouze standardní dietou a byla utracena ve věku 8 týdnů života. Druhá skupina (n=8) byla po týdnech standardní diety krmena aterogenní dietou s obsahem 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů. Pro detekci exprese NF- κ B byla použita metodika nepřímé imunohistochemie s detekcí signálu pomocí sekundární protilátky značené červeným fluorochromem CY3.

U 8 týdenních myší byla exprese NF- κ B lokalizována zejména na cévním endotelu a také v několika buňkách hladké svaloviny medie. Ve skupině 16 týdenních myší byla exprese NF- κ B lokalizována zejména v oblasti aterosklerotických plátů a v medii pod nimi a to zejména hladkými svalovými buňkami a makrofágy.

Výsledky prokázaly indukci zánětlivé reakce během aterogeneze různými buňkami v cévách apoE/LDLr-deficientních myší, což bude využito zejména v dalších studiích.

Abstract

The aim of this diploma thesis was to set immunohistochemical detection of nuclear transcription factor kappaB (NF- κ B). We studied its expression in aortic sinus in 8 and 16 weeks old apoE/LDL receptor deficient mice.

Female apoE/LDL receptor mice were divided into two groups. The first group (n=8) was represented by eight weeks old mice. In the 16 weeks group (n=8) mice were fed with cholesterol enriched diet (0.15% of cholesterol) for the period of eight weeks. Indirect fluorescence immunohistochemistry with detection of antibody reaction with CY3 red fluorochrome was used for the detection of active form of NF- κ B.

In 8 weeks old mice the NF- κ B expression was detected in endothelial cells and in some smooth muscle cells in vessel media. In 16 weeks old mice the NF- κ B expression was detected inside atherosclerotic plaques and in vessel media under these plaques predominantly by macrophages and smooth muscle cells.

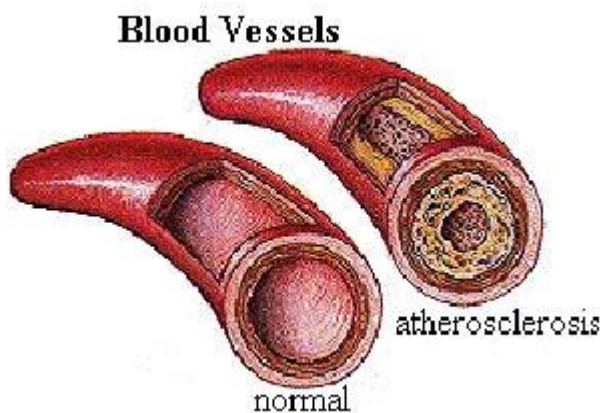
In conclusion, the results of immunohistochemical analysis showed induction of inflammatory reaction by various cells during atherogenesis in blood vessels of apoE/LDL receptor deficient mice which will be used in prospective studies.

1. ÚVOD

Zvýšená hladina cholesterolu může vést k ukládání tukových látek do stěn cév, množení hladkých svalových buněk ve stěnách tepen, čímž se postupně zužuje jejich průsvit a pružnost. Tento proces se nazývá ateroskleróza. Rozvoj kornatění tepen začíná již v poměrně mladém věku, aterosklerotické pláty byly objeveny již u lidí ve věku 15-30 let. Následkem těchto změn klade stěna cév protékající krvi větší odpor. Velký odpor krve zapříčiněný zúženou cévou potom vede k vysokému krevnímu tlaku (arteriální hypertenzi) (1).

Ateroskleróza je příčinou více než poloviny všech úmrtí v západních průmyslových státech.

Obrázek 1 - Zdravá céva a céva postižena aterosklerózou (převzato z www.veda.cz)



Jde o pomalu postupující onemocnění tepen, při němž je ztlustěna intima fibrózními uloženinami, které postupně zužují lumen a současně jsou místem vzniku krvácení a tvorby trombů.

Pruhy usazených tuků jsou nejčastější patrnou známkou aterosklerózy. Jde o subendotelové nakupení velkých tuk obsahujících buněk.

Později vznikají fibrózní plaky neboli ateromy, příčina klinické manifestace aterosklerózy. Tyto plaky jsou nahromaděním monocytů, mikrofágů, pěnových buněk, T-lymfocytů, pojiva, zbytků rozpadlé tkáně a krystalů cholesterolu.

Z důležitých rizikových faktorů aterosklerózy je několik tzv. ovlivnitelných, např. konkrétně hyperlipidemie, hypertenze, kouření, diabetes mellitus a hyperhomocysteinemie. Neovlivnitelné rizikové faktory jsou vyšší věk, mužské pohlaví a genetická zátěž. Nevhodnými faktory je rovněž životní styl chudý na pohyb a bohatý na stres.

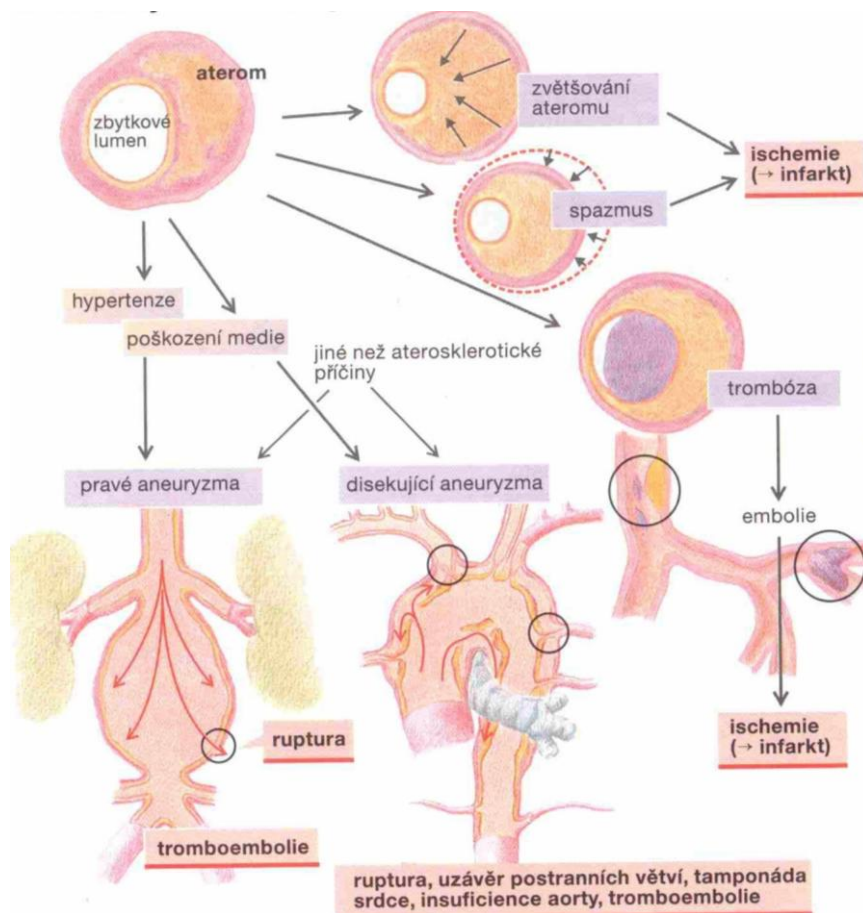
Cholesterol je částice tuku v krvi, která má velmi důležitou funkci v některých životně důležitých tělesných procesech. Tvoří základní stavební prvek buněčných membrán a některých hormonů. Určitý podíl cholesterolu tělo přijímá v podobě potravy, ale většinou je vytvářen v organismu játry.

Zvýšená hladina cholesterolu v krvi je proto buď způsobena stálou a zvýšenou konzumací zejména živočišných tuků, nebo zvýšenou syntézou cholesterolu v játrech. Tato hypercholesterolémie je v častých případech dědičná, a může se vyskytnout i v případech, kdy je výhradně upřednostňována rostlinná strava a zdravá výživa.

Většina cholesterolu je v těle transportováno prostřednictvím LDL lipoproteinů, a ateroskleróza úzce koreluje se zvýšenými hodnotami LDL. Defekt LDL receptorů vede velmi časně k ateroskleróze. Zvláštním rizikovým faktorem se zdá být lipoprotein(a), což je LDL, který obsahuje apolipoprotein apo(a). Apo(a) se podobá plazminogenu a váže se na fibrin, takže apo(a) působí zřejmě antifibrinolyticky a tím trombogenně.

Následky ukládání plaků mohou vést k velmi závažným onemocněním, jako je například ischemická choroba srdeční, chronická ischemická choroba končetin s bolestivou zátěžovou ischemií. Dalšími následky tvorby plaků jsou ztuhnutí cévní stěny, vznik trombů, které uzavírají zbylý průsvit a mohou způsobit periferní embolizace, krvácení do plaků a do cévní stěny (2).

Obrázek 2 – Následky aterosklerózy (Stefan Silbernagl, Atlas patofyziologie 2001)



2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Oběhový systém se skládá ze dvou hlavních podsystemů. První tvoří podsystem krevních cév a druhý cév lymfatických. System krevních cév je složen z následujících součástí:

- Srdce

Srdce má za úkol přečerpávat a rozvádět krev po celém těle.

- Arterie

Arterie transportují krev s živinami a kyslíkem do tkání.

- Kapiláry

Kapiláry umožňují výměnu mezi tkáněmi a krví.

- Vény

Jejich úkolem je odvádět produkty metabolismu směrem k srdci.

System lymfatických cév začíná ve slepě zakončených kanálcích, lymfatických kapilárách, které se spojují a tvoří stále větší a větší cévy, které ústí v systému krevních cév a vyprazdňují se do velké žíly poblíž srdce. Lymfatický systém tedy navrací tkáňový mok z tkáňového prostoru do krve.

Cévy jsou složeny ze tří základních částí a mají celou řadu společných strukturálních znaků, přestože v těch nejmenších cévách jsou tři základní části značně zjednodušeny (3).

Krevní cévy jsou tedy obvykle složeny z následujících vrstev neboli tunik:

- Tunica intima
- Tunica media
- Tunica adventitia

Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cév. Endotelové buňky se nacházejí na bazální lamině. Subendotelová vrstva je uložena

pod endotelem a tvoří ji řídké vazivo, které může někdy obsahovat stopy hladkého svalstva.

Tunica media se skládá především ze šroubovitě vinutých koncentrických vrstev hladkých svalových buněk. Mezi těmito svalovými buňkami se nachází rozdílné množství kolagenních a elastických vláken a též proteoglykanů. Lamina elastica interna je vrstva oddělující intimu od medie v artériích. Je složena z elastinu a průchody v ní se vyskytující umožňují difuzi látek nutných pro výživu buněk uložených v hloubi arteriální stěny (3).

Tunica adventitia je tvořena podélně orientovanými kolagenními a elastickými vlákny. Adventicie plynule přechází do vaziva orgánu, kterým céva prochází.

2.1 Arterie

Arterie zásobují tkáň krví obohacenou o živiny a kyslík. Dělí se dle velikosti na arterioly, svalové arterie středního či velkého kalibru a velké arterie elastického typu. Obecně jsou stěny arterií silnější než stěny žil (4).

Arterioly mají relativně úzký průsvit a obecně jejich průměr je menší než 0,5 mm. Jejich lumen vystylají endotelové buňky, které jsou podobné endoteliím souvislých kapilár. Subendotelová vrstva je tenká a svalová medie je tvořena několika vrstvami hladkých svalových buněk. Adventicie je podobně jako subendotelová vrstva jen velmi tenká.

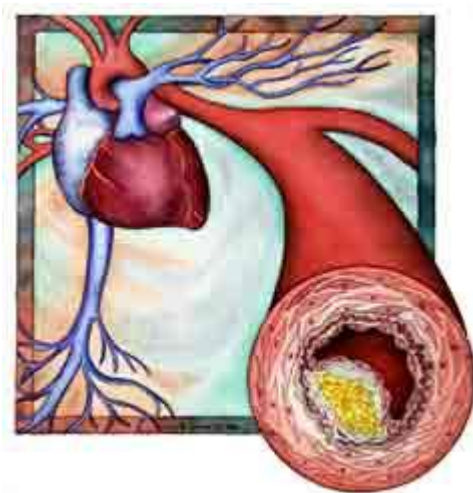
Většina pojmenovaných arterií v lidském těle jsou arterie svalového typu. Na rozdíl od arteriol je subendotelová vrstva poněkud tlustší, intima je shodná. Je zřetelně vyvinuta membrana elastica interna. Medie může obsahovat desítky vrstev hladkých svalových elementů. Adventicie je složena z kolagenních a elastických vláken, částečně i malého počtu fibroblastů a tukových buněk. V adventicii se nacházejí rovněž lymfatické cévy a nervy (4).

Aortu a její hlavní větve řadíme k velkým artériím elastického typu. V těchto cévách se objevuje žlutavé zabarvení a je podmíněno vysokým obsahem elastinu v medii.

Intima je vystlána endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je silná. Medie je složena z několika perforovaných elastických membrán, koncentricky uspořádaných, jejichž počet narůstá s věkem. Tunica adventitia je tenká a obsahuje elastická a kolagenní vlákna (5).

V průběhu života procházejí krevní cévy postupnými neustálými změnami v jejich struktuře. Každá z arterií má svou vlastní charakteristiku stárnutí. Koronární arterie jsou tepny, které se mění nejdříve, a to již po 20. roku života. Ostatní arterie se začínají měnit až po čtyřicítce. Koronární arterie jsou nejvíce náchylné k rozvoji aterosklerózy.

Obrázek 3 - Řez koronární cévou (převzato z www.ordinace.cz)



2.2 Kapiláry

Kapiláry umožňují různý stupeň metabolické výměny mezi krví a okolními tkáněmi. Jsou tvořeny z jediné vrstvy endotelových buněk mezenchymálního původu, které jsou stočeny do trubice uzavírající cylindrický prostor. Kapiláry dělíme do skupin, v závislosti na struktuře endotelových buněk a na přítomnosti či chybění bazální laminy.

Souvislé neboli somatické kapiláry se vyznačují chyběním fenestrací v endotelu. Kapiláry tohoto druhu nacházíme ve všech typech svalů, ve vazivu, exokrinních žlázách a v nervové tkáni.

Fenestrované neboli viscerální kapiláry obsahují fenestrace ve stěnách endotelových buněk a tyto jsou odděleny přepážkou. S těmito kapilárami se setkáváme například v ledvinách, ve střevech a obecně v místech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi (3).

Dalším typem jsou kapiláry opět fenestrované, ale neobsahující přepážky. Jsou charakteristické pro ledvinná tělíska.

Čtvrtým typem jsou sinusoidy, které se vyznačují křivolakým průběhem, a nápadně rozšířeným průsvitem. Obsahují též fenestrace v endotelové stěně. Sinusoidní kapiláry najdeme hlavně v játrech a v hematopoetických orgánech, jako je kostní dřev a slezina.

Hustota sítě kapilár má vztah k metabolické aktivitě tkání a představuje přechodní zónu mezi arteriálním a žilním systémem. Tkáně, ve kterých je vysoký obrat metabolismu, se vyznačují bohatou sítí kapilár. Primárně jsou to hlavně játra, srdeční a kosterní svalstvo (3).

2.3 Vény

Žíly za účasti hladkého svalstva a specializovaných chlopní navracejí krev zpět do srdce. Představují rezervoár, v němž se nachází většina celkového objemu krve. Rozdělujeme je na venuly a dále na vény středního a velkého kalibru.

Venuly jsou tvořeny intimou, která se skládá z endotelu, tenké medie, neobsahující žádnou nebo jen několik vrstev hladké svaloviny a z adventicie. Kolagenní vlákna vyplňují adventicii.

Vény malého a středního kalibru mají intimu opatřenou tenkou subendotelovou vrstvou, která někdy může téměř chybět. V adventicii jsou dobře vyvinuta kolagenní vlákna.

Velké vény mají silněji vyvinutou intimu. Tunica media je tenčí. Vůbec nejsilnější je adventicie. Ve velkých žilách obsahuje podélné svazky hladké svaloviny. Tato hladká svalovina napomáhá k zesílení cévní stěny a též zabraňuje roztažení cévy. Díky

cirkulárnímu a longitudinálnímu uspořádání hladkých svalů jsou tyto cévy schopny čerpat peristalticky krev k srdci.

Uvnitř malých a středně velikých vén se nacházejí chlopně, které jsou složeny ze dvou poloměsíčitých záhybů tunica intima. Jsou kryty po obou stranách endotelem a vyskytuje se v nich elastické vazivo.

Chlopně především nacházíme v žilách končetin. Usměrnují žilní krev směrem k srdci. Tyto žíly jsou obklopeny kosterními svaly, které posilují hnací sílu srdce (4).

Obrázek 4 - Koronární cévy v srdci (převzato z www.medicina.cz)

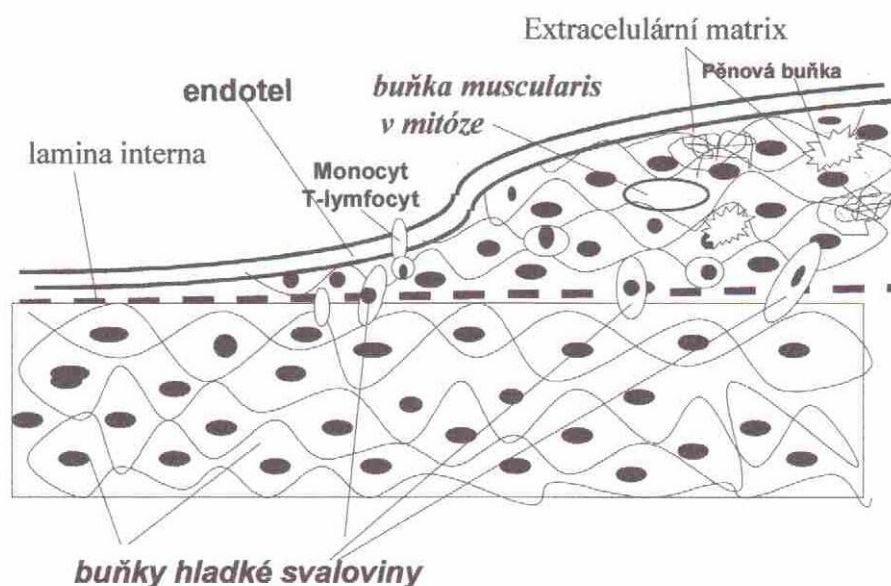


3. PATOGENEZE ATEROSKLERÓZY

Ateroskleróza je celkové onemocnění, které postihuje velké a střední cévy tepenného řečiště, nejvýznamnější jsou léze srdečních věnčitých tepen, extrakraniálních tepen zásobujících mozek, popřípadě dalších orgánů.

V patogenezi aterosklerózy hraje velkou roli rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny arterií, který je následkem hemodynamického poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech. Nejprve dochází k poruše cévního endotelu za tvorby růstových faktorů, adhezních molekul, cytosinů (6).

Obrázek 5 - Ztlušťování stěny artérie při aterogenezi (Patogeneze aterosklerózy, Jaroslav Masopust)



Monocyty/makrofágy a T-lymfocyty jsou aktivovanými endotelovými buňkami přitahovány do místa léze. Zvýšená permeabilita endotelové výstelky umožňuje pronikání lipoproteinových částic do subendotelového prostoru. Působením reaktivovaných forem kyslíku a dusíku dochází k lipoperoxidaci. Makrofágy pohlcují uvolněný cholesterol a vznikají pěnové buňky (7).

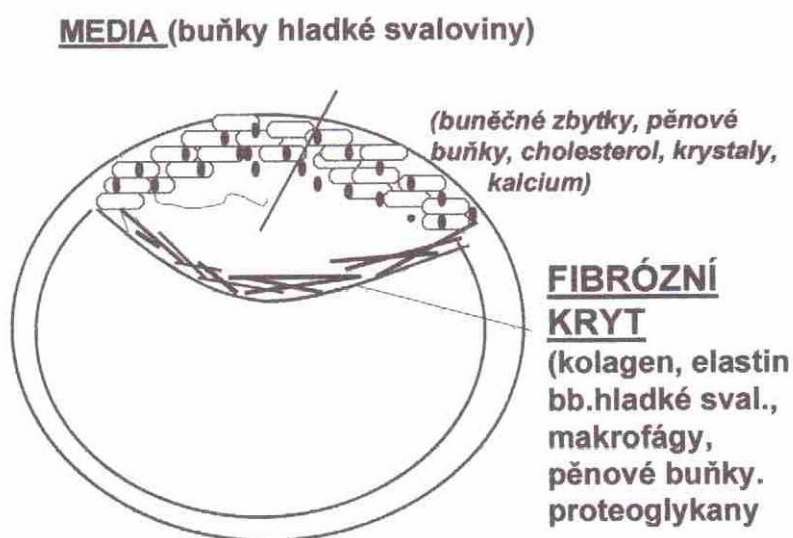
Celý tento proces vede k tvorbě ateromového plátu, stěna cévy se v poškozeném místě ztlusťuje a vyznačuje se prokoagulačními vlastnostmi.

Ruptura obalu ateromového plátu, krvácení do plátu, trombóza nebo embolus, to jsou klinické důsledky tohoto onemocnění (8).

3.1 Faktory aterogeneze

LDL-částice, jsou hlavní příčinou poškození stěny arterií. Mohou být různě modifikovány, a to oxidací, glykací, agregací, asociací s proteoglykany nebo inkorporací do imunních komplexů (9).

Obrázek 6 - Schéma ateromového plátu (Patogeneze aterosklerózy, Jaroslav Masopust)



Minimalizovat škodlivý účinek oxidovaných LDL-částic lze jejich odstraněním či sekvestrací. Rovněž protektivní charakter má aplikace vitamínu E jako antioxidantu, protože snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a dusíku.

Modifikované LDL-částice stimulací replikace monocytů/makrofágů podporují rozvoj zánětlivé reakce. HDL-částice naproti tomu působí protektivně, neboť umožňují reverzní transport cholesterolu do jater.

Homocystein svou zvýšenou koncentrací v plazmě navozuje poruchu endotelu, tím, že zvyšuje oxidační stres, aktivuje proteinkinázu indukovanou stresem, má vliv na tloušťku intimy a medie arterií, na pružnost stěny arterií, zvyšuje produkci kolagenu a má protrombotický účinek. Hladinu homocysteinu může normalizovat podávání vitamínů skupiny B (10).

Diabetes spojený se zvýšenou hladinou cukru v krvi podporuje vznik oxidačního stresu, a tím přispívá k rozvoji endotelové dysfunkci. Hyperglykémie se nepřímo podílí na adhezi leukocytů k endotelu, taktéž navozuje aktivaci vaskulární hladké svaloviny. Tyto procesy společně vedou ke zvýšení tonu cévní stěny arterií, a tím ke ztluštění stěny intimy (11).

Hypertenze přispívá k rozvoji aterogeneze prostřednictvím působení angiotenzinu II, který má vliv na krevní tlak, stimuluje proliferaci buněk cévní hladké svaloviny. Má totiž afinitu ke specifickému receptoru (AT-1), což v konečném důsledku znamená uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v různých buňkách stěny arterií. Receptor (AT-1) též zvyšuje aktivitu lipoxxygenázy, což podporuje zánětlivou reakci v buňkách hladké svaloviny (12).

Infekce též navozuje rozvoj aterosklerózy. Existují důkazy o této souvislosti nalezením *herpetických virů* a *Chlamydia pneumoniae* v ateromových plátech a zvýšený titr protilátek proti některým infekčním agens, jako je *Helicobacter pylori*, *Cytomegalovirus*, *Hemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *virus Epstein a Barrové*.

Zánět je typickou obrannou reakcí organismu na různé poškození, jejíž snahou je najít místo poškození, odstranit příčinu, dále nefunkční tkáň a následně zhojit či regenerovat tkáň.

Na vznik zánětu mají především vliv prozánětlivé mediátory, komplement, koagulační systém, leukocyty, trombocyty, endotel (13).

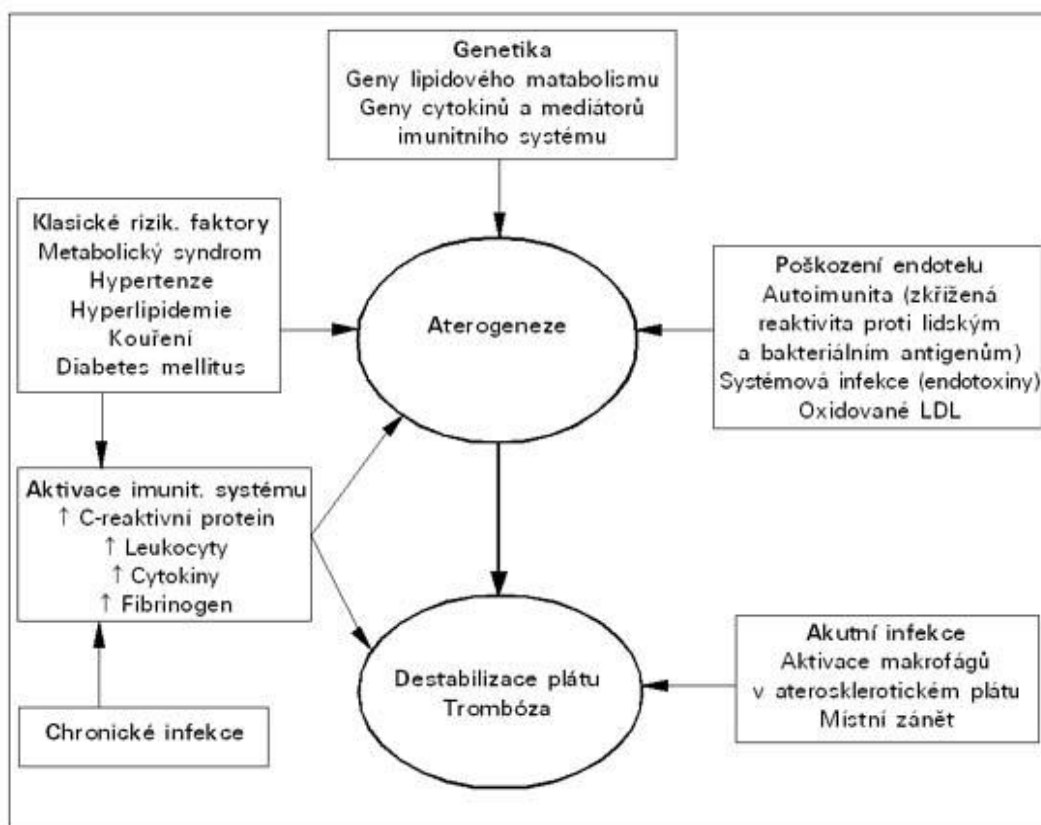
K poškození cévní stěny dochází prostřednictvím změn v proudu krve například zvýšenou turbulencí. Následkem je produkce specifických molekul endotelem, které jsou odpovědné za akumulaci, migraci a adhezenci monocytů, T-lymfocytů. Tyto adhezni molekuly jsou receptory pro glykokonjugáty a integriny na T-lymfocytech a monocytech.

V cigaretovém kouři je obsaženo téměř 5 000 různých škodlivých sloučenin. Mezi nimi jsou desítky známých kancerogenních látek jako oxid uhelnatý, amoniak, akrolein, aceton, nikotin, benzyperyeny, hydrochinon, oxidy dusíku (14).

Tyto sloučeniny ovlivňují funkci imunokompetentních buněk a tím imunitní systém, jako například nikotin. Působí na přirozenou i získanou imunitu.

Akrolein navozuje sníženou rezistenci vůči infekci, působením na leukocyty. Množství lymfoidní tkáně snižuje dlouhodobá expozice vůči benzyperenům. Hydrochinon brání rozvoji T-lymfoblastů, znesnadňuje buněčný cyklus dělení.

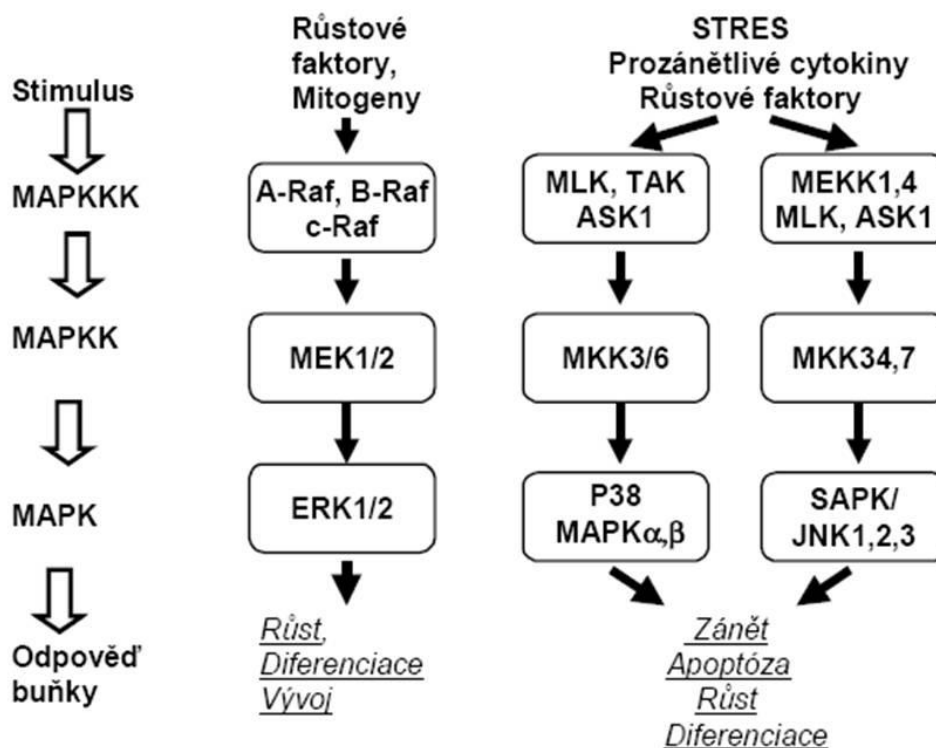
Obrázek 7 - Faktory ovlivňující aterogenezi (převzato z www.tigis.cz)



3.2 Signální dráha MAPK

Signální dráhy zprostředkovávají odpověď buněk na podněty způsobující aterosogenezi. Nejvýznamnější je dráha MAPK (mitogeny a stresem aktivovaná proteinkináza). Její zjednodušené schéma je na následujícím obrázku.

Obrázek 8 - Signální dráha MAPK (Patogeneze aterosklerózy, Jaroslav Masopust)



Transkripční faktory mají hlavní úlohu při buněčné transdukci signálů odpovídajících na aterosenní stimuly (15).

Transkripčními faktory jsou:

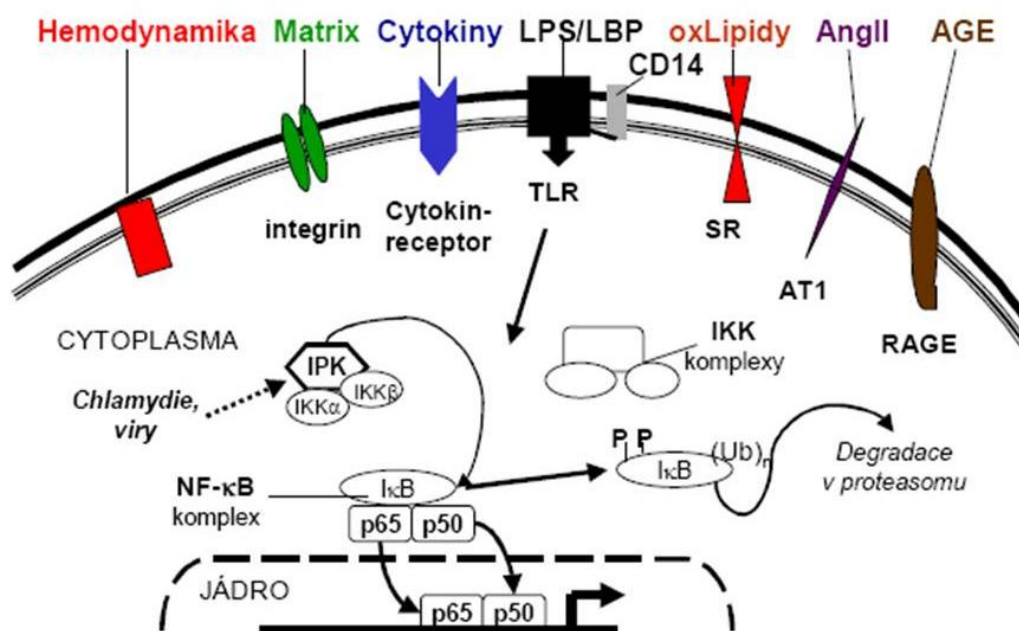
- Nukleární transkripční faktor kappa B (NF κ B)
- Receptory aktivovaného proliferátoru peroxizómů (PPAR)
- Receptory aktivátorového proteinu 1 (AP-1)

Role transkripčního faktoru NF κ B při rozvoji aterosklerózy je velmi komplexní a integrační. Různé stimuly prostřednictvím signálních drah aktivují NF κ B, tím, že

fosforylují jeho inhibitor, ten je následně rozkládán v proteosomech. Uvolněné diméry NF κ B jsou translokovány do jádra, kde navozují transkripci, ta vede k produkci cytokinů, leukocytových adhezních molekul, chemokinů. Dále tyto uvolněné diméry aktivují geny aktivující proliferaci, ale i apoptózu buněk podílejících se na dysfunkci cévní stěny (16).

Zpětná inhibice aktivace transkripčního faktoru kappa B je umožněna tím, že NF κ B aktivuje geny pro expresi svého vlastního inhibitoru (IKK).

Obrázek 9 - Schéma účinku NF κ B při rozvoji aterosklerózy
(Patogeneze aterosklerózy, Jaroslav Masopust)



Za chemotaxi a nahromadění makrofágů v tukových prouzcích jsou odpovědné chemokiny. Receptory na povrchu monocytů a T-buněk se zvýšeně tvoří při jejich aktivaci, stejně jako produkce glykoproteinových molekul vážících selektiny. Interakce ligandu s receptorem aktivuje dále monocyty, je odpovědná za jejich proliferaci a lokalizuje zánětlivý proces v poškozeném místě.

Receptory aktivovaného proliferátoru peroxizómů tvoří skupinu jaderných hormonálních receptorů. Tyto receptory zvyšují transkripci genů pro apolipoproteiny a přispívají tím k vyššímu reverznímu transportu cholesterolu. Též negativně ovlivňuje syntézu prozánětlivého enzymu cyklooxygenázy 2 (COX-2). Prostřednictvím působení

na metabolismus cholesterolu a triacylglycerolů ovlivňuje plazmatický transport lipidů, děje se tak kontrolou syntézy a rozkladu žlučových kyselin v játrech.

4. NF- κ B A JEHO ROLE V ATEROGENEZI

NF- κ B je transkripční faktor, jehož aktivace je spojena s nástupem aterosklerózy. Jedná se o dimer složený z proteinů rodiny Rel, které mají společný úsek domény Rel, která umožňuje dimerizaci, nukleární translokaci, navázání DNA a interakci s inhibitory NF- κ B (17).

NF- κ B molekulou je regulována řada genů, jejichž produkty jsou pravděpodobně zapojeny do procesu aterosklerózy. Adhezní molekuly jako VCAM-1, ICAM-1, a E-selektin a rovněž chemokiny, monocytový chemoatraktivní protein 1 (MCP-1), a interleukin (IL-8) pomáhají infiltraci arteriální intimy cirkulujícími mononukleárními leukocyty (18).

Aktivace jiných NF- κ B dependentních genů jako je tkáňový faktor by se mohla mít vliv na zvýšení koagulace na endoteliálním povrchu.

Stimulace NF- κ B je kontrolována rodinou inhibitorů neboli I κ B, které se váží na diméry NF- κ B a zakrývají sekvenci zodpovědnou za vazbu NF- κ B na DNA, a tím udržují celý komplex v cytoplazmě.

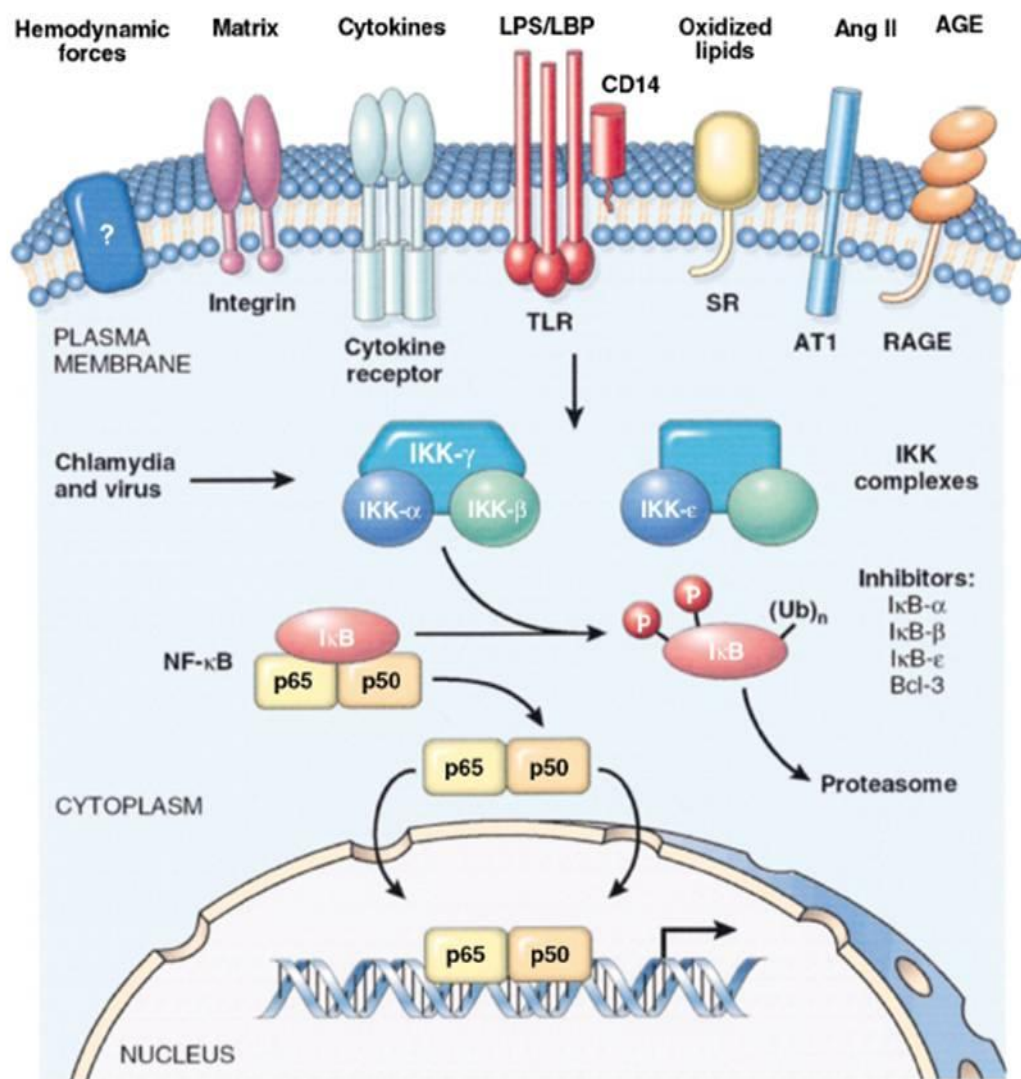
NF- κ B je řízena různými stimuly prostřednictvím fosforylace a aktivace komplexu I κ B kinázou (IKK). Tento komplex se skládá z IKK- α a IKK- β heterodimérů, řady IKK- γ podjednotek a pravděpodobně dalších složek, které mají menší význam. Aktivovaný IKK komplex fosforyluje I κ B, které jsou pak rychle štěpeny proteosomy a stimuluje je k rozpadu. Po uvolnění z inhibitoru se diméry NF- κ B přemísťují z cytoplazmy do jádra, kde váží cílové geny a aktivují transkripci (19).

NF- κ B aktivuje různé cílové geny, které hrají roli v patogenezi cévních onemocnění, včetně cytokinů, chemokinů, adhezních molekul, leukocytů a rovněž geny regulující proliferaci buněk a umožňují přežití buněk.

NF- κ B také aktivuje geny I κ B- α a tím zvyšuje produkci vlastního inhibitoru. Obnovená exprese I κ B- α snižuje aktivaci NF- κ B a expresi NF- κ B-dependentních genů. Autoregulační systém NF- κ B/I κ B- α zajišťuje, že indukce NF- κ B je přechodná a že

aktivovaná buňka se vrátí do klidového stavu. Fyziologická modulace a patologická aktivace systému NF- κ B může přispívat ke změnám v genové expresi, ke kterým dochází během aterosgeneze (19).

Obrázek 10 - Schéma aktivace NF- κ B molekuly (19).



4.1 Aktivovaná molekula NF- κ B a její cílové geny u aterosklerotických lézí

Za použití monoklonálních protilátek (mAb), které dokáží rozeznat vazebné místo pro I κ B na proteinu p65 transkripčního faktoru, objevili Brand, K et al. 1996 aktivovanou NF- κ B v intimě a medii v oblastech výskytu aterosklerotické léze u buněk hladkých svalů, makrofágů a endoteliálních buněk. Aktivovaná NF- κ B byla identifikována u aterosklerózy in situ, ale téměř se nevyskytovala u zdravých cév bez aterosklerózy (17).

U zdravých cév není NF- κ B aktivní. In situ analýza p50 a p65 u normální cévní stěny prokazuje pouze difúzní cytoplazmatickou expresi. U p50 ani u p65 antiséra není vidět žádná akumulace v játrech. U hladkých svalových buněk normální cévní stěny jsou NF- κ B proteiny omezeny na cytosol, což naznačuje, že regulační systém je v klidu. Uvnitř lidských ateromů obsahují jádra buněk hladkých svalů intimy oba proteiny Rel, což naznačuje, že transkripční faktor je aktivován (17).

Před nedávnem byla aktivovaná NF- κ B molekula objevena u buněk intimy v koronárních tepnách prasat, která dostávala hypercholesterolemickou stravu. Tato pozorování nasvědčují tomu, že NF- κ B hraje roli u aterosklerózy (20).

Indukovat proliferaci buněk nebo stimulovat přežití buněk v místech, kde se tvoří léze, mohou i jiné produkty cílových genů včetně cyklinů D1. Koordinovaná indukce NF- κ B-dependentních genů může mít značný proaterogenní účinek na cévní stěnu. Pokud aktivace přetrvává, může stimulovat migraci a proliferaci buněk hladkých svalů a rovněž pokračující infiltraci cirkulujícími monocyty. Aktivace těchto buněk může vést k uvolnění dalších cytokinů a chemokinů a rovněž ke tvorbě růstového faktoru. NF- κ B molekula tedy může být klíčová jak pro počáteční odezvy na aterogenní signál, tak následné rozšíření během expanze a progresu lézí (20).

Příkladem indukovatelné NF- κ B-dependentní genové exprese během rozvoje ranných aterosklerotických lézí, je indukce VCAM-1. VCAM-1 je adhezní molekula, jejíž exprese je indukována zánětlivými cytokiny na endoteliálních buňkách, buňkách hladkého svalu a některých nevaskulárních buňkách. Její exprese byla studována ve velkém rozsahu u modelů zvířat s a u lidských tkání. Hypercholesterolemie u apoE deficientních myší nebo králíků, kteří dostávali cholesterol, reguluje endoteliální VCAM-1 expresi těchto oblastí.

Přidání cholesterolu do stravy králíků má za následek rychle zjistitelnou VCAM-1 expresi u ascendentní aorty za jeden týden, což předchází tvorbě pěnových buněk lézí (19).

V případě, že jsou leukocyty adherovány v místech tvorby aterosklerotických lézí, je tento proces řízen NF- κ B-dependentními chemokiny, jako je MCP-1. Tento chemoatraktivní chemokin je vysoce exprimován u aterosklerotických lézí u lidí a u modelů zvířat s aterogenezí, kde se vědci domnívají, že přispívá k iniciaci a rozšíření infiltrace arteriální stěny monocytu.

Pro účinnou tvorbu raných aterosklerotických lézí je nutná koordinovaná indukce NF- κ B-dependentních genů, výborným příkladem je exprese jak VCAM-1 tak MCP-1 v místech tvorby aterosklerotické léze (19).

5. MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY

Pro studium aterosklerózy jsou v současné době nejvýhodnější myší modely. U myši chované v běžných podmínkách není možný rozvoj aterosklerózy (Jawien 2004). Je tomu tak hlavně díky nízké hladině cholesterolu (přibližně kolem 1-1,15 mmol/l), a to nejvíce v HDL formě. Myš není jediný druh, u kterého se tento jev vyskytuje, naopak neschopností rozvoje aterosklerózy se vyznačují všichni hlodavci (21).

Kmeny používané jako myší modely aterosklerózy:

- Kmen apolipoprotein E – deficientních myší
- Kmen LDL receptor deficientních myší
- Kmen s dvojitým deficitem APOE/LDLr

První experimenty s myšmi byly provedeny v 80. letech minulého století, a to se třemi konkrétními kmeny. Myši byly podrobeny nefyziologické dietě označované jako „Paigen dieta“, která obsahovala 1,25% cholesterolu, 15% tuku, a 0,5% kyseliny cholové.

Výsledky studie prokázaly, že nejnáchylnějším kmenem k iniciaci aterosklerózy se ukázal kmen C57BL/6J a naopak nejvíce odolávajícím byl kmen C3H (22).

Obrázek 11 - Ateromové pláty zužující cévu (převzato z www.stefajir.cz)



Nevýhodou této studie byl obecně malý průkaz vývinu aterosklerózy. Pouze u kmenu C57BL/6J se objevily v menší míře v oblasti tzv. aortálního sinu (kořene aorty) tukové proužky.

Dalším problémem byl velký obsah kyseliny cholové v dietě myši, který zapříčinil celkový zánět, poškození jater a tvorbu žlučových kamenů (23).

Přes všechny zjištěné potíže se kmen C57BL/6J stal výchozím prvkem pro další genetické modifikace s cílem vytvořit takový model, který bude pro studium aterosklerózy co nejvýhodnější.

Obrázek 12 - Myši model C57BL/6J (převzato z www.slaccas.com)



5.1 Kmen apolipoprotein E - deficientních myši

Dvě na sobě nezávislé skupiny vytvořili v roce 1992 kmen apolipoprotein E deficientních myši (apoE^{-/-}) (24).

Apolipoprotein E (apoE^{-/-}) se nachází na povrchu některých lipoproteinů, především na HDL, VLDL a chylomikronech. Díky němu může probíhat interakce těchto lipoproteinů s jaterním receptorem pro LDL (LDLR) a též s tzv. „LDL-related proteinem (LRP)“. Lipoproteinová lipáza je ovlivňována apoE, dále apoE může stimulovat produkci VLDL játry a je zcela nezbytný pro eflux cholesterolu do HDL z různých buněk a tkání včetně cév (25).

Makrofágy aktivně sekretují apoE, a tím je zajištěna inhibice přeměny makrofágů na pěnové buňky. Nedostatek apoE vede k poruše clearance chylomikronů vznikajících ve střevě, VLDL tvořících se v játrech a IDL (26).

Lidé s hyperlipoproteinémií mají podobný lipidový profil jako myši s tímto deficitem dle Fredricksonovy klasifikace. Vznik aterosklerózy u apoE myši je tedy patogeneticky dán díky spontánnímu nárůstu hladin cholesterolu především ve VLDL frakci (27).

Oblast tzv. aortálního sinu je místem, kde se u těchto deficientních myši nacházejí nejvýraznější aterosklerotické léze. Dále můžeme léze lokalizovat v oblasti malého zakřivení aortálního oblouku, při odstupech karotid, interkostálních, mesenterických a renálních artérií, dále v koronárních artériích, femorálních a konečně také brachiocefalických artériích. Tyto oblasti výskytu lézí u myši jsou podobné místům nálezu plátů u lidí.

Iniciace tvorby plátů u těchto myši je většinou pozorována kolem 5-6 týdne věku, objevují se léze typu tukových proužků. Již předtím, asi ve 4-5 týdnu, se však na těchto místech predisponovaných k ateroskleróze nalézá zvýšená endoteliální exprese VCAM-1 (28). Asi v 10. týdnu života lze v plátech nalézt též malé množství hladkých svalových buněk. Kolem 20. týdne se již objevují fibrózní pláty s lipidovým jádrem a fibromuskulární čepičkou složenou z hladkých svalových buněk a extracelulární matrix, zejména kolagenu (29). Defragmentace *lamina elastica interna* a kalcifikace se objevují kolem 32. týdne života. Tzv. komplikované léze s trombózami a krvácením do plátu se objevily pouze v několika studiích a byly pozorovány v *arteria brachiocephalica* (30). Z hlediska progresu a závažnosti rozvoje aterosklerózy je rozdíl, je-li podávána standardní nebo vysokotuková či cholesterolová dieta.

Typicky se používá tzv. Western type diety obsahující 21% tuku (11% nasycených tuků) a 0,15% cholesterolu, která do určité míry odráží složení diety u lidí.

V současné době jsou tyto myši asi nejpoužívanějším myším modelem aterosklerózy a zároveň i pro další genetické modifikace, zejména pro podobnost typů a výskytu aterosklerózy jako je tomu u lidí (31).

5.2 Kmen LDL receptor deficientních myši

Dalším typem myši používané ke studiu aterosklerózy je kmen LDL receptor deficientních myši (LDLR). Je to zároveň model lidské familiární hypercholesterolémie, který se vyznačuje dysfunkcí LDL receptoru (32).

Tyto myši mají nižší hladiny cholesterolu, přesto u nich dochází zejména po podávání vysokotukové/cholesterolové diety k nárůstu zejména LDL, ale částečně též k VLDL cholesterolu, což lépe vystihuje rozložení lipoproteinů u lidí (33).

Na rozdíl od apoE deficientních myši však tento kmen netvoří spontánně aterosklerotické pláty, ale k jejich rozvoji musí být použita právě vysokotuková/cholesterolová dieta, například tzv. Western type dieta. Zhruba po 6 měsících po podávání této diety mohou být pozorovány ateromatózní pláty také u tohoto kmene (34).

5.3 Kmen s dvojitým deficitem – apolipoproteinu E a LDL receptoru

V roce 1994 byl vyvinut poslední kmen a použit pro studium clearance lipoproteinů a pro studium receptorů pro jednotlivé lipoproteiny u myši (32). Jednalo se o kmen s dvojitým deficitem a to apolipoproteinu E a LDL receptoru. Znovu se u tohoto modelu vyvíjí spontánní hypercholesterolémie, která je ovšem vyšší než u apoE a LDLR deficientních myši. Taktéž dynamika iniciace aterosklerózy je rychlejší než u výše zmíněných kmenů (Witting 1999). Z tohoto důvodu byl tento model určen jako velmi vhodný pro studium vlivů různých substancí na progresi aterogeneze (35).

U tohoto modelu byly popsány významné protizánětlivé a hypolipidemické účinky, které jsou poměrně vzácné ve studiích statinů u myších modelů aterosklerózy (36).

K problémům souvisejícím se studiem aterosklerózy pomocí myších modelů patří zejména jejich velikost, množství odebraného materiálu (krve), možnosti studovat aterosklerózu jinde než v aortě. Kromě toho myši nemají CEPT (cholesterol ester transfer protein) (31).

6. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktoru kappaB (NF- κ B). Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší ve věku 8 a 16 týdnů.

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Jackson Laboratories (USA) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

7.1 Zvířata a předepsaná dieta

Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Jedna skupina (n=8) byla krmena pouze standardní dietou a byla utracena ve věku 8 týdnů života. Druhá skupina (n=8) byla po týdnech standardní diety krmena aterogenní dietou s obsahem 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

7.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

7.3 Imunohistochemie

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (*Leica, Praha, Česká republika*), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese NF-κB byla použita metodika nepřímé imunohistochemie s detekcí signálu pomocí sekundární protilátky značené červeným fluorochromem CY3.

Primární protilátky

K detekci exprese markeru NF-κB v cévní stěně byla použita polyklonální protilátka rabbit anti-mouse NF-κB ve zředění 1/100 (*Santa Cruz, USA*). Tato protilátka je navržena aby detekovala pouze aktivovanou (fosforylovanou) formu p-NFκB p65 (Ser 536) a to v buněčném jádře.

Pracovní postup

Fluorescenční detekce p-NFκB p65 (Ser 536)

sušení tkáňových řezů v termostatu (60 min)

fixace v acetonu (-20°C; 30 min)

oschnutí řezů (15 min)

- | | |
|---|-------------|
| 1. PBS | 5 minut |
| 2. 10% goat serum v PBS (900 μl PBS + 100 μl goat sera) | 30 minut |
| 3. p-NFκB p65 (Ser 536) ředěná v BSA | 1 hodina |
| 4. PBS | 2 x 5 minut |
| 5. goat anti rabbit CY3 | 30 minut |
| 6. PBS | 2 x 5 minut |
| 7. DAPI – dobarvení jader buněk | 5 minut |
| 8. PBS | 2 x 5 minut |
| 9. Montování krycího sklíčka v DABCO | |

7.4 Statistická analýza

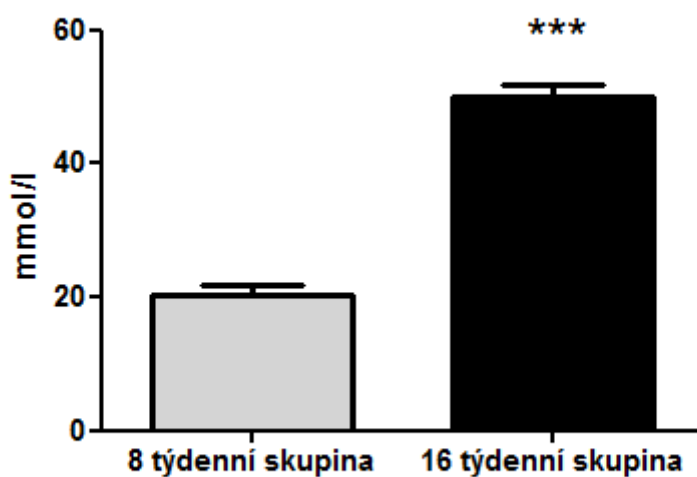
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.

8. VÝSLEDKY

8.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky zcela dle očekávání ukázaly výrazný a významný nárůst hladin cholesterolu u 16 týdenních myší, kterým byla podávána dieta s obsahem cholesterolu ve srovnání s 8 týdenní skupinou ($***P \leq 0,001$) (viz. graf 1).

*Graf. 1 – Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší. Signifikantní nárůst je pozorován u 16 týdenní skupiny ve srovnání s 8 týdenní skupinou ($***P \leq 0,001$).*



8.2 Imunohistochemická analýza

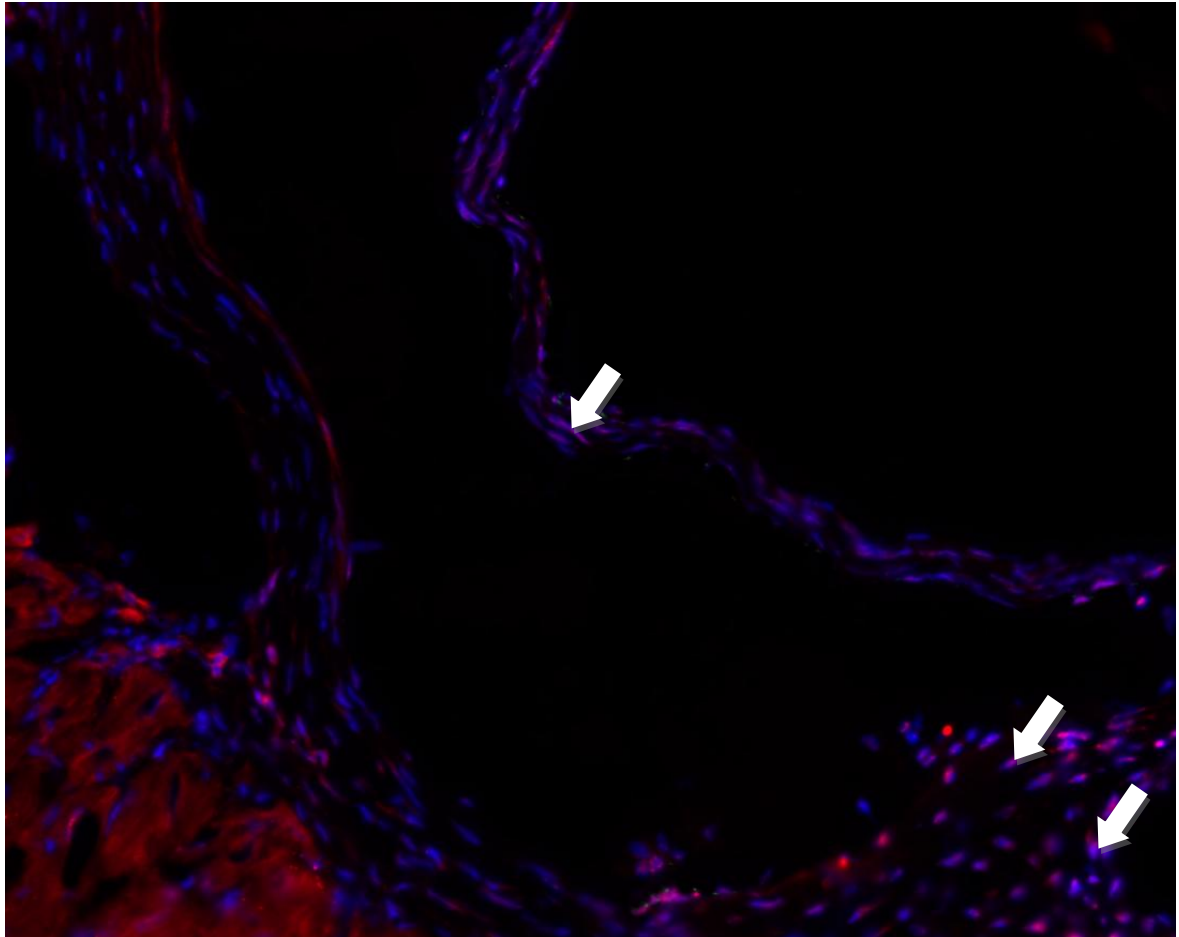
Imunohistochemické barvení NF- κ B v oblasti aortálního sinu

Výsledky morfologické analýzy korelovaly s biochemickými nálezy. U 8 týdenní skupiny myši byly nalezeny pouze velmi malé léze charakteru tukových proužků a to zejména v oblasti kořene aorty. V descendentní části aorty jsme pozorovali cévy bez aterosklerotických plátů. Naproti tomu v 16 týdenní skupině byly nalezeny velké a pokročilé aterosklerotické pláty s nekrotickými jádry v plátech. Tyto výsledky se pak také odrazily v detekci NF- κ B.

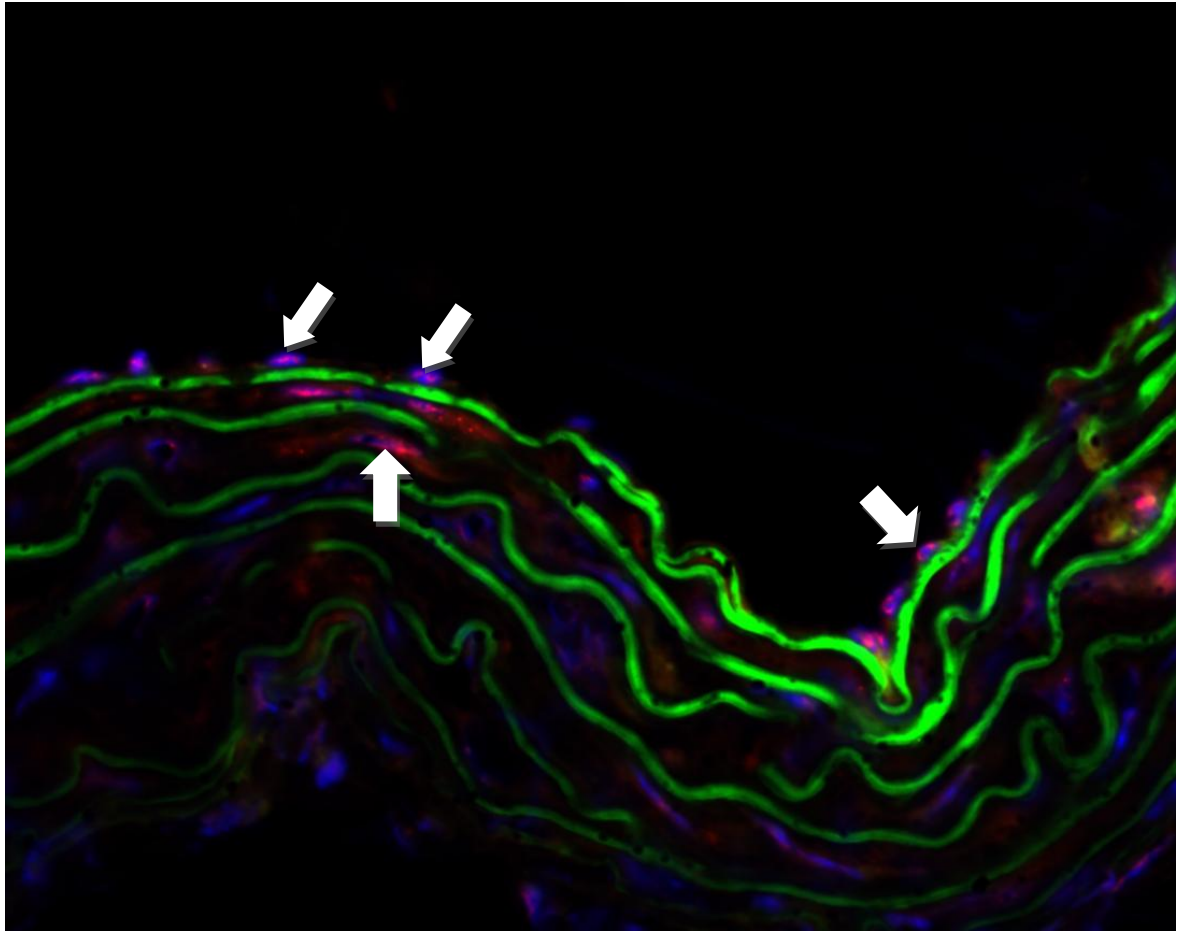
V 8 týdenní skupině byla exprese NF- κ B pozorována vždy u několika jader endoteliálních buněk a dále také v jádrech některých hladkých svalových buněk v medii cévy (obr. 14). V oblasti aortálního sinu byla také exprese NF- κ B pozorována v jádrech buněk tvořících srdeční semilunární chlopeň (obr 13).

V 16 týdenní skupině myši byla exprese NF- κ B pozorovaná rovnoměrně v celých aterosklerotických plátech a také v medii aorty, kde byla pozitivita nalezena zejména v hladkých svalových buňkách. Poměrně nízká exprese NF- κ B byla pozorována v cévním endotelu plátů.

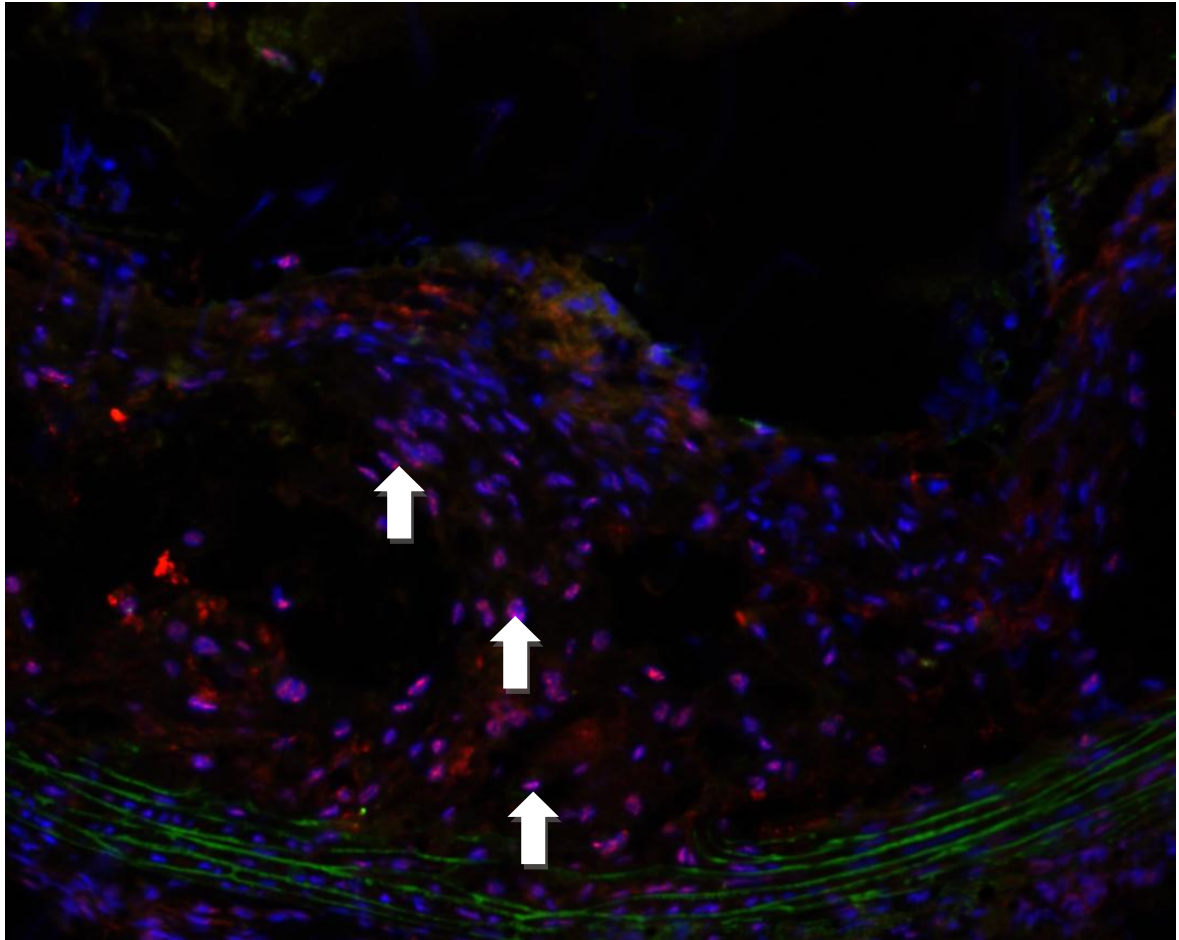
Obrázek 13 – Imunohistochemické barvení NF- κ B u 8 týdenní skupiny zvířat. Pozitivita NF- κ B je vyjádřena červenou barvou v buněčných jádrech. Buněčná jádra jsou dobarvena DAPI. Pozitivita je tedy zobrazena jako průnik červené a modré barvy. Exprese je pozorována zejména v těle odstupující chlopně (šipky). Zvětšeno 200x.



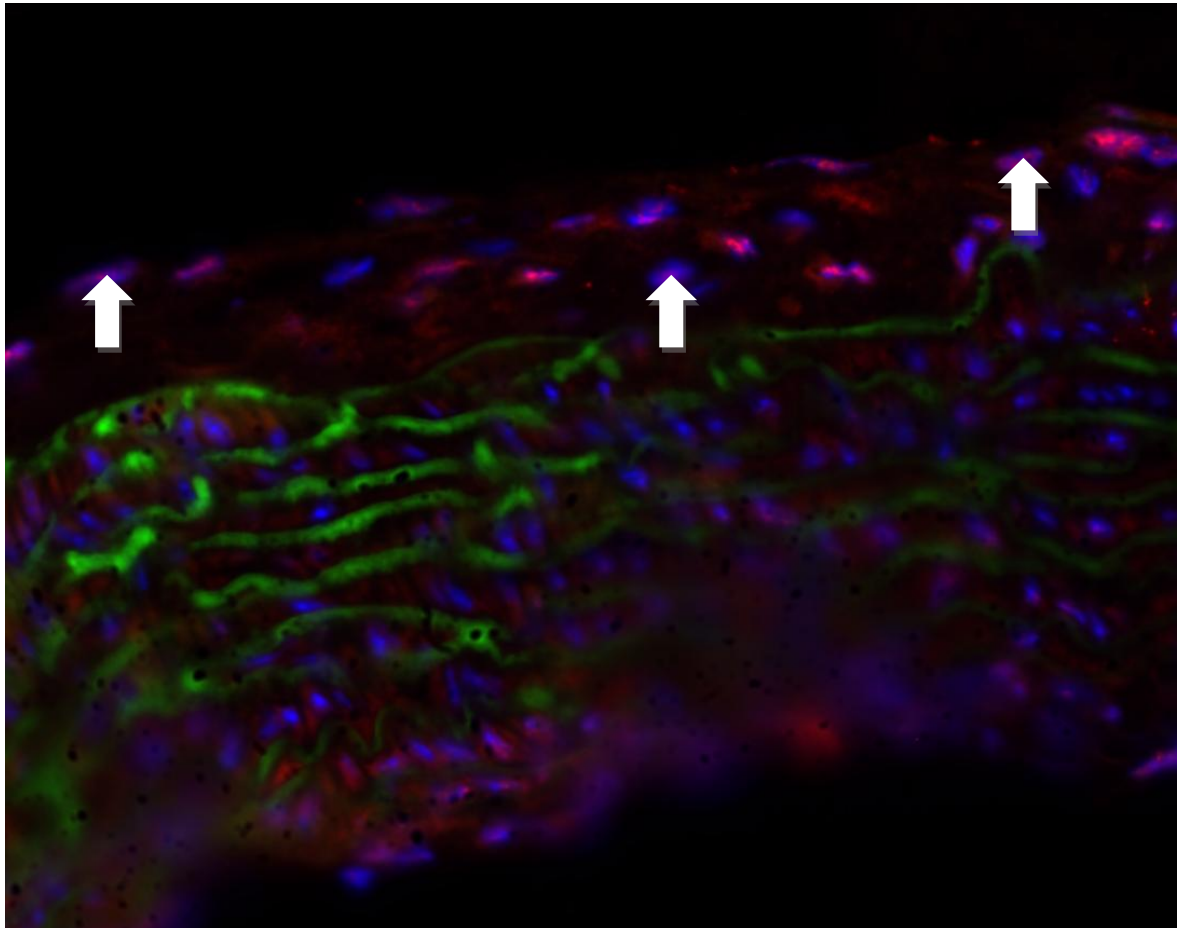
Obrázek 14 – Imunohistochemické barvení NF- κ B u 8 týdenní skupiny zvířat. Pozitivita NF- κ B je vyjádřena červenou barvou v buněčných jádrech. Buněčná jádra jsou dobarvena DAPI. Zelená barva ukazuje autofluorescenci elastických vláken v medii cévy. Exprese NF- κ B je pozorována zejména na intaktním endotelu a také v jádrech některých hladkých svalových buněk (šipky). Zvětšeno 400x.



Obrázek 15 – Imunohistochemické barvení NF- κ B u 16 týdenní skupiny zvířat. Pozitivita NF- κ B je vyjádřena červenou barvou v buněčných jádrech. Buněčná jádra jsou dobarvena DAPI. Zelená barva ukazuje autofluorescenci elastických vláken v medii cévy. Exprese NF- κ B je pozorována v celém aterosklerotickém plátu a také v medii cévy(šipky). Zvětšeno 200x.



Obrázek 16 – Imunohistochemické barvení NF- κ B u 16 týdenní skupiny zvířat. Pozitivita NF- κ B je vyjádřena červenou barvou v buněčných jádrech. Buněčná jádra jsou dobarvena DAPI. Zelená barva ukazuje autofluorescenci elastických vláken v medii cévy. Exprese NF- κ B je pozorována v malém aterosklerotickém plátu (šipky) ale na cévním endotelu . Zvětšeno 400x.



9. DISKUZE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (37).

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (22). Velkou výhodou je, že myši jsou v laboratorních podmínkách velmi dobře kontrolovatelné, zkrmované přesně definovanou stravou, což je u dlouhodobých studií na lidech nereálné. V lidské populaci se ale provádí velké množství studií asociačních, které sledují genetický vliv na aterosklerotický rozvoj. Jak již bylo zmíněno výše, myši jsou vůči rozvoji aterosklerózy velice odolné, z experimentů vyplynulo, že nejlépe se dá aterogeneze indukovat, u kmene myši C57BL/6. Pokud je tento myši druh krmen stravou bohatou na cholesterol obsahující kyselinu cholovou, k rozvoji lézí dochází. Od lidského stavu se ale liší, a to jak lokalizací, tak histologickou povahou. Tento proces se také spíše přisuzuje zánětlivé reakci, než genetické predispozici (29).

Cílem této diplomové práce zavést metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktoru kappaB (NF- κ B). Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myši ve věku 8 a 16 týdnů.

My jsme v naší diplomové práci použili ApoE/LDL receptor deficientní myši, které vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu

svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik (32).

NF- κ B je transkripční faktor, jehož aktivace je spojena s nástupem aterosklerózy. Jedná se o dimer složený z proteinů rodiny Rel, které mají společný úsek domény Rel, která umožňuje dimerizaci, nukleární translokaci, navázání DNA a interakci s inhibitory NF- κ B (17).

NF- κ B molekulou je regulována řada genů, jejichž produkty jsou pravděpodobně zapojeny do procesu aterosklerózy. Adhezní molekuly jako VCAM-1, ICAM-1, a E-selektin a rovněž chemokiny, monocytový chemoatraktivní protein 1 (MCP-1), a interleukin (IL-8) pomáhají infiltraci arteriální intimy cirkulujícími mononukleárními leukocyty (18).

V této diplomové práci byly nalezeny jisté rozdíly v expresi aktivované formy NF- κ B u 8 týdenních myší a 16 týdenních myší, kterým byla podávána aterogenní dieta. Jednak byl pozorován významný nárůst hladin cholesterolu u 16 týdenních myší ve srovnání s 8 týdenní skupinou. Obecně, byla exprese lokalizována pouze v buněčných jádrech, což poukazuje na detekci exprese pouze aktivované formy NF- κ B. U 8 týdenních myší byla exprese lokalizována zejména na cévním endotelu a také v několika buňkách hladké svaloviny medie. Tato exprese tedy poukazuje na aktivaci endotelu, která má také souvislost se zvýšenou expresí zejména adhezních molekul (18). Exprese formy NF- κ B v medii rovněž pravděpodobně poukazuje na aktivaci hladkých svalových buněk a změnu jejich fenotypu na tzv. proaterogenní fenotyp, který vede k migraci těchto buněk do cévní intimy a produkci extracelulární matrix (38). Ve skupině 16 týdenních myší byla exprese lokalizována zejména v oblasti aterosklerotických plátů a medii pod nimi a to zejména hladkými svalovými buňkami a makrofágy což jasně ukazuje na progresi zánětlivé reakce zejména v oblasti plátů a případně v medii pod nimi. Překvapivě exprese nebyla velmi významná na cévním endotelu což může ukazovat na jisté snížení aktivity endotelu v této fázi aterogeneze.

Zavedení metodiky pro detekci aktivované formy NF- κ B v této diplomové práci sloužilo především k možnosti využití sledování exprese tohoto markeru v dalších studiích,

kde se bude hodnotit jeho lokalizace zejména s ohledem na expresi endoglin dependentní kaskády, která je základním výzkumným tématem na KBLV.

10. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktoru kappaB (NF- κ B). Sledovali jsme jeho expresi v kořenu aorty u apoE/LDLr-deficientních myší ve věku 8 a 16 týdnů.

Podávání cholesterolové diety dle očekávání vedlo k signifikantnímu nárůstu hladin cholesterolu u 16 týdenních myší ve srovnání s 8 týdenní skupinou.

Byla zavedena metodika pro detekci aktivované formy NF- κ B, což bylo prokázáno detekcí protilátky pouze v buněčných jádrech.

U 8 týdenních myší byla exprese NF- κ B lokalizována zejména na cévním endotelu a také v několika buňkách hladké svaloviny medie.

Ve skupině 16 týdenních myší byla exprese NF- κ B lokalizována zejména v oblasti aterosklerotických plátů a v medii pod nimi a to zejména hladkými svalovými buňkami a makrofágy.

Výsledky tedy prokázaly indukci zánětlivé reakce během aterogeneze různými buňkami v cévách apoE/LDLr-deficientních myší, což bude využito zejména v dalších studiích.

11. LITERATURA

1. Bjorkbacka H: Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 19: 548-9, 2008.
2. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V and Luno J: Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14: 243-8, 2007.
3. Junquera: Základy histologie. 2002.
4. Klika: Histologie. Praha, 1986.
5. Dvorak M: Histologie pro posluchače lékařské fakulty. Brno, 1984.
6. Galkina E and Ley K: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2292-301, 2007.
7. Nylaende M, Kroese A, Stranden E, Morken B, Sandbaek G, Lindahl AK, Arnesen H and Seljeflot I: Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 11: 21-8, 2006.
8. Trostorf F, Buchkremer M, Harmjan A, Kablau M, Jander S, Geiger K, Schmitz-Rixen T, Steinmetz H and Sitzer M: Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29: 528-35, 2005.
9. Hjelstuen A, Anderssen SA, Holme I, Seljeflot I and Klemsdal TO: Effect of lifestyle and/or statin treatment on soluble markers of atherosclerosis in hypertensives. *Scand Cardiovasc J* 41: 313-20, 2007.
10. Mathez C, Trueb L, Darioli R and Waeber G: [Homocystein and cardiovascular risk: is dosage useful?]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 93: 2093-7, 2004.
11. Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Aasarod K and Holmen J: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47: 396-405, 2006.
12. Catena C, Novello M, Lapenna R, Baroselli S, Colussi G, Nadalini E, Favret G, Cavarape A, Soardo G and Sechi LA: New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens* 23: 1617-31, 2005.

13. Mehta JL, Saldeen TG and Rand K: Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 31: 1217-25, 1998.
14. Cannon RO, 3rd: Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 44: 1809-19, 1998.
15. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, Korabiowska M and Korbut R: Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 56: 483-9, 2005.
16. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G and Egido J: Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 147: 253-61, 1999.
17. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA and Neumeier D: Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97: 1715-22, 1996.
18. Brasen JH, Hakkinen T, Malle E, Beisiegel U and Yla-Herttuala S: Patterns of oxidized epitopes, but not NF-kappa B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* 166: 13-21, 2003.
19. Collins T and Cybulsky MI: NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107: 255-64, 2001.
20. Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B and Naruszewicz M: Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 75: 1287-302, 2004.
21. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-8, 1996.
22. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D and Albee D: Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64: 215-21, 1987.
23. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA: Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231-40, 1987.
24. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA and Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-71, 1992.

25. Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL and Mahley RW: Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 268: 10160-7, 1993.
26. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M and Hofker MH: Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med* 43: 470-9, 2005.
27. Nachtigal P, Jamborova G, Pospisilova N, Pospechova K, Solichova D, Zdansky P and Semecky V: Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci* 9: 222-30, 2006.
28. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40, 1994.
29. Daugherty A: Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 323: 3-10, 2002.
30. Johnson J, Carson K, Williams H, Karanam S, Newby A, Angelini G, George S and Jackson C: Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment. *Circulation* 111: 1422-30, 2005.
31. Moghadasian MH, Frohlich JJ and McManus BM: Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest* 81: 1173-83, 2001.
32. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL and Brown MS: The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-5, 1994.
33. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE and Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883-93, 1993.
34. Olszanecki R, Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Gebaska A, Korabiowska M, Chlopicki S and Korbut R: Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 56: 627-35, 2005.
35. Jawien J, Nastalek P and Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17, 2004.
36. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S and Semecky V: Atorvastatin has hypolipidemic and anti-

inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. Life Sci 82: 708-17, 2008.

37. Mareckova Z, Heller S and Horky K: [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. Vnitr Lek 45: 46-50, 1999.

38. Moiseeva EP: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. Cardiovasc Res 52: 372-86, 2001.